

学校编码: 10384

分类号____密级____

学号: 21720061152242

UDC____

厦门大学

硕 士 学 位 论 文

抗人类免疫缺陷病毒衣壳蛋白单克隆抗体
的制备与筛选及其识别表位的初步分析

Preparation and Selection of Anti-Human
Immunodeficiency Virus Capsid Protein Monoclonal
Antibody and Preliminary Analysis of Epitope

阙玉琼

指导教师姓名: 夏宁邵 教授

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2009 年 10 月

论文答辩时间: 2009 年 11 月

学位授予日期: 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2009 年 10 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为(夏宁邵)课题(组)的研究成果,获得(863计划项目专题(2006AA020905)和国家自然科学基金(No. 30600106))课题(组)经费或实验室的资助,在(厦门大学国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心)实验室完成。

(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

目录	I
中文摘要	V
英文摘要	VI
ABBREVIATION (缩略词)	VIII
前 言	1
1 HIV 流行情况	1
2 HIV 的结构	3
3 HIV 病毒的生活周期	10
4 HIV 病毒的分类与命名	12
5 HIV 的致病机制	14
6 HIV 感染所诱发的免疫反应	15
7 HIV 感染的检测方法	18
8 蛋白质结构预测	25
9 本论文的研究目的、思路和意义	29
材料与方法	30
1 材料	30
2 方法	36
结果与分析	55
1 重组 p24 抗原的表达	55
2 p24 单克隆抗体	62
3 抗原抗体反应性分析	64

4 广谱性单抗 A7A4 的鉴定	70
5 利用分子对接技术预测 HIV-1 p24 表位	73
讨论	78
1 重组 p24 抗原的表达	78
2 p24 单克隆抗体	81
3 抗原抗体复合物的分子对接	82
小结	85
展望	86
参考文献	87
致谢	94

Table of Contents

Table of Contents	I
Abstract in Chinese	V
Abstract in English	VI
ABBREVIATION	VIII
Preface.....	1
1 HIV prevalence.....	1
2 The structure of HIV	3
3 Life circle of HIV	10
4 Cassification and naming of HIV	12
5 The pathogenic mechanism of HIV	14
6 HIV infection-induced immune response	15
7 Detection methods of HIV	18
8 Prediction of protein structure	25
9 The thinkings,purpose and meanings of this reseach.....	29
Materials and Methods.....	30
1 Materials	30
2 Methods.....	36
Results and Analysis	55
1 Expression of recombinant p24 antigen.....	55
2 Anti-p24 Monoclonal Antibody	62
3 Analysis of antigen-antibody reaction.....	64

4 Identification of broad-spectrum monoclonal antibody A7A4.....	70
5 Prediction of epitope of HIV-1 p24 using protein structure modeling	73
Discussion.....	78
1 Expression of recombinant p24 antigen.....	78
2 Anti-p24 Monoclonal Antibody	81
3 molecular docking of antigen-antibody complex	82
Brief Summary	85
Prospect.....	86
References	87
Acknowledgements.....	94

摘要

艾滋病是以全身免疫系统严重损害为特征的传染性疾病,感染者终生携带人类免疫缺陷病毒(HIV)。目前对该病仍没有有效治疗手段,多数感染者在数年的潜伏期后发病,最终死于感染或肿瘤。1981年首次报道艾滋病后,HIV以惊人的速度在全球蔓延,感染了全球两百分之一的人口,对社会和经济造成了重大影响。进行HIV抗体及抗原检测,尽早发现HIV感染从而切断传播途径,是目前控制HIV传播的重要措施之一。因此,开发出灵敏、快速、廉价、适合大规模检测的诊断试剂显得尤为重要。p24抗原水平被认为是HIV感染的特异性标志,对血液及其它体液中p24抗原的检测有助于HIV的早期诊断、预后判断及评价抗病毒治疗的效果,因此,p24抗原在HIV诊断试剂研发中备受青睐。

本研究通过大肠杆菌表达系统进行HIV-1 M组A、B、C、D、F和H 6个亚型及2个流行重组型B/C、D/C嵌合等代表株p24蛋白的表达,所表达的p24蛋白在经过盐析沉淀,复性,阳离子交换色谱这一系列纯化步骤之后,其纯度能够达到90%以上。通过间接ELISA检测HIV阳性血清中的p24抗体,结果显示这些蛋白具有较好的反应活性。初步的免疫学分析证明表达的抗原可有效诱导小鼠产生抗p24的免疫应答。进一步对系列p24蛋白与本研究筛选到的23株单克隆抗体的反应性进行研究,筛选出6株广谱性单抗。通过单抗与p24蛋白的Western Blotting分析和单抗交互阻断实验,初步分析了抗原抗体的结合表位,至少存在9个表位,其中4个可能为保守性表位。通过进一步实验分析了广谱性单抗A7A4的性质,其与各亚型p24蛋白均具有较高的相对亲和力,Western Blotting检测结果显示其能与多聚体反应,免疫荧光则进一步验证了A7A4对天然p24蛋白同样具有较好的活性。此外,在本研究中尝试利用分子对接对广谱性单抗A7A4与p24的结合表位进行预测,可能的结合表位为不连续氨基酸残基组成的构象表位: E¹⁸⁷,T¹⁸⁸,V¹⁹¹,Q¹⁹²,D¹⁹⁷,K¹⁹⁹,T²⁰⁰,I²⁰¹,L²⁰²,K²⁰³,A²⁰⁴,L²⁰⁵,G²⁰⁶,P²⁰⁷,A²⁰⁹,M²¹⁴,T²¹⁶,A²¹⁷,C²¹⁸,Q²¹⁹。

关键词: HIV-1 p24 蛋白 单克隆抗体 抗原表位 分子模拟

Abstract

AIDS is one of devastating infectious diseases which cause serious damage to immune system, and infected people have to live with HIV until they die. There is no effective cure for AIDS by now means that most infected people are onset after several years latent period and eventually died of recurrent infections or tumors. AIDS was first reported in 1981, and then spread at an alarming rate in the global infecting 1/200 of the world population, which has a significant impact on social and economic. Cutting off the transmission by means of detection of HIV antibody and antigen, which is an important measure to control the spread of HIV. It needs to develop a sensitive, rapid, inexpensive diagnostic reagent which is also suitable for large-scale test. The p24 antigen level is usually considered to be a specific marker of HIV infection. The detection of HIV p24 antigen in blood and other body fluids contribute to the early diagnosis, prognosis and evaluation of the effect of antiretroviral therapy. Therefore, p24 antigen plays an important role in HIV diagnostics R & D.

In this study, p24 proteins derive from HIV-1 M group (subtype A, B, C, D, F, H and popular recombinant B/C, D/C) were expressed by low-cost *E.coli* expression system. After purified by salting and ion-exchange chromatography, the purity of p24 proteins can reach to 90%. The purified p24 proteins react to HIV-positive serum by indirect ELISA for the detection of p24 antibodies showed that these proteins have better reactivity. Immunological analysis shows that these p24 proteins can effectively induce an immune response of mice to p24 antigen. The result of comparison of different p24 proteins to 23 anti-p24 mAbs shows that there are six broad-spectrum mAbs. The analysis of mAbs against p24 protein by western blotting and cross-blocking ELISA among the anti-p24 mAbs implies that there are at least nine epitopes in p24 protein, four of which may be conservative epitopes. We further evaluate the character of broad-spectrum mAb A7A4 by several experiments. The result of A7A4 relative affinity reveals it has high relative affinity with p24 proteins.

A7A4 also can react with the polymer of p24 proteins and the natural p24 proteins. The structure of A7A4 Fab fragment was modeled by homology modeling. Then A7A4 Fab is subject to dock with two p24 structures found in PDB (PDB ID:1E6J and 3H4E). Possible epitope, which consisting of non-consecutive amino acid residues are E¹⁸⁷, T¹⁸⁸, V¹⁹¹, Q¹⁹², D¹⁹⁷, K¹⁹⁹, T²⁰⁰, I²⁰¹, L²⁰², K²⁰³, A²⁰⁴, L²⁰⁵, G²⁰⁶, P²⁰⁷, A²⁰⁹, M²¹⁴, T²¹⁶, A²¹⁷, C²¹⁸, Q²¹⁹.

Key words: HIV-1; p24 ; monoclonal antibody; antigen epitope; molecular modeling

ABBREVIATION (缩略词)

aa: amino acid, 氨基酸

AD: Antigenic determinant, 抗原决定簇

AIDS: Acquired Immune Deficiency Syndrome, 获得性免疫缺陷综合征

Amp: Ampicillin, 氨苄青霉素

bp: base pair, 碱基对

cDNA: Complementary DNA, 互补 DNA

CDR: Complementarity Determining Region, 抗原决定簇

CH: Constant Region of Heavy Chain, 重链恒定区

CL: Constant Region of Light Chain, 轻链恒定区

CMV: Cytomegalovirus, 巨细胞病毒

CTL: Cytolytic T lymphocyte, 细胞毒性 T 淋巴细胞

Da: Dalton, 道尔顿

DC: Dendritic cell, 树突细胞

DMSO: dimethyl sulfoxide, 二甲亚砜

DNA: Deoxyribonucleic acid, 脱氧核糖核酸

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbant Assay, 酶联免疫吸附测定

IFA: Indirect immunofluorescent assay, 间接免疫荧光检测

FBS: Fetal bovine serum, 胎牛血清

FDA: Food and drug administration, 美国食品和药物管理局

GAM: Goat Anti-Mouse, 山羊抗小鼠

GAH: Goat Anti-Human, 山羊抗人

HAART: Highly active antiretroviral therapy, 高活性的抗逆转录病毒治疗

HIV: Human immunodeficiency virus, 人免疫缺陷病毒

HRP: Horseradish Peroxidase, 辣根过氧化物酶

Ig: Immunoglobulin, 免疫球蛋白

Kan: Kanamycin, 卡那霉素

kD: kilo Daltons, 千道尔顿

LacZ: β 半乳糖苷酶

LTR: Long terminal repeat, 长末端重复序列

mAb: monoclonal antibody, 单克隆抗体

MCS: Multiple cloning site, 多克隆位

MLV: Murine leukemia virus vector, 小鼠白血病病毒载体

mRNA: Messenger RNA, 信使 RNA

MW: Molecular Weight, 分子量

NMR: Nuclear Magnetic Resonance, 核磁共振

nt: Nucleotide, 核苷

Ori: Origin, 复制起始位点

ORF: Open Reading Frame, 开放读码框架

PBMC: Peripheral blood mononuclear cells, 外周血单核细胞

PCR: polymerase chain reaction, 聚合酶链式反应

PH: hydrogen ion concentration, 氢离子浓度指数

polyA: Polyadenosine, 多聚腺苷酸

RNA: Ribonucleic acid, 核糖核酸

RT-PCR: Reverse transcription polymerase chain reaction, 反转录聚合酶链式反应

SAS: Solvent Accessible Surface, 溶剂可及化表面积

VH: Variable Region of Heavy Chain, 重链可变区

VL: Variable Region of Light Chain, 轻链可变区

VLP: Virus-like particle, 病毒样颗粒

WB: Western Blotting, 蛋白印迹实验

WHO: World Health Organization, 世界卫生组织

前言

1 HIV 流行情况

人类免疫缺陷病毒(Human Immunodeficiency Virus,HIV),属于逆转录病毒科(Retroviridae)、慢病毒属(Lentivirus)、灵长类慢病毒群(Primate lentivirus Group),是一类有包膜的 RNA 病毒,会导致以全身免疫系统严重损害为特征的艾滋病。艾滋病全称获得性免疫缺陷综合征(Acquired Immune Deficiency Syndrome, AIDS),感染者终生携带 HIV,多数感染者在数年的潜伏期后发病,最终死于感染或肿瘤。HIV 病毒广泛存在于感染者的血液、精液、阴道分泌物、唾液、尿液、乳汁、脑脊液等体液中,其中以血液、精液、阴道分泌物中浓度最高,传播主要方式是性接触传播、血源性传播和母婴垂直传播。其中性传播是最重要的传播途径,目前世界上 75% HIV-1 感染都是通过性生活而传播的。

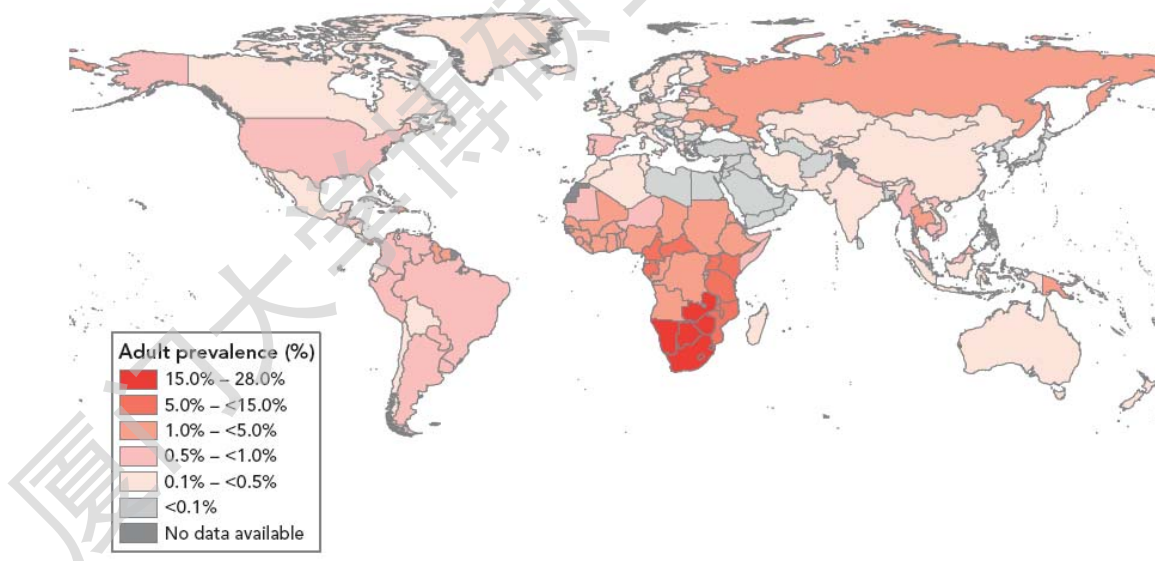


图 1. 2007 年全球 HIV 流行情况

Fig.1. A global view of HIV infection,2007

图片来源:UNAIDS report 2008

自 1981 年首次报道^[1]艾滋病后, HIV 以惊人的速度在全球蔓延(图 1),感染全球两百分之一人口,对社会和经济造成了重大影响。2007 年,全世界共有 3300

万人感染 HIV，其中 250 万人为新发感染，210 万人死于艾滋病并发症^[2]。撒哈拉南部非洲是 HIV 感染最为严重的地区，共有约 2250 万人感染 HIV，2007 年该地区死于 AIDS 人数占全球 AIDS 死亡人数的 76%。

我国艾滋病疫情发展形势严峻，HIV 的传播以静脉注射吸毒者共用不洁针头，以及血液交叉污染为主，异性性接触传播感染人数也在迅速增长，艾滋病正从高危人群向普通人群迅速蔓延。据卫生部、联合国艾滋病规划署和世界卫生组织联合对中国艾滋病疫情进行的估计，中国现存 HIV 感染者和艾滋病病人约 70 万，其中可能有 44 万人尚未进行 HIV 检测。截至 2008 年 9 月 30 日，累计报告 HIV/AIDS 病例 264302 例，其中 AIDS 患者 77753 例，报告死亡 34864 例。2008 年 1-9 月共报告新增 HIV 感染者和 AIDS 患者 44839 例，报告死亡 6897 例^[3]。

另外，我国艾滋病疫情的地区分布差异较大（图 2）。云南、四川、广西、新疆、河南、广东、贵州等七个省份报告的总病例数约占全国的 80%。

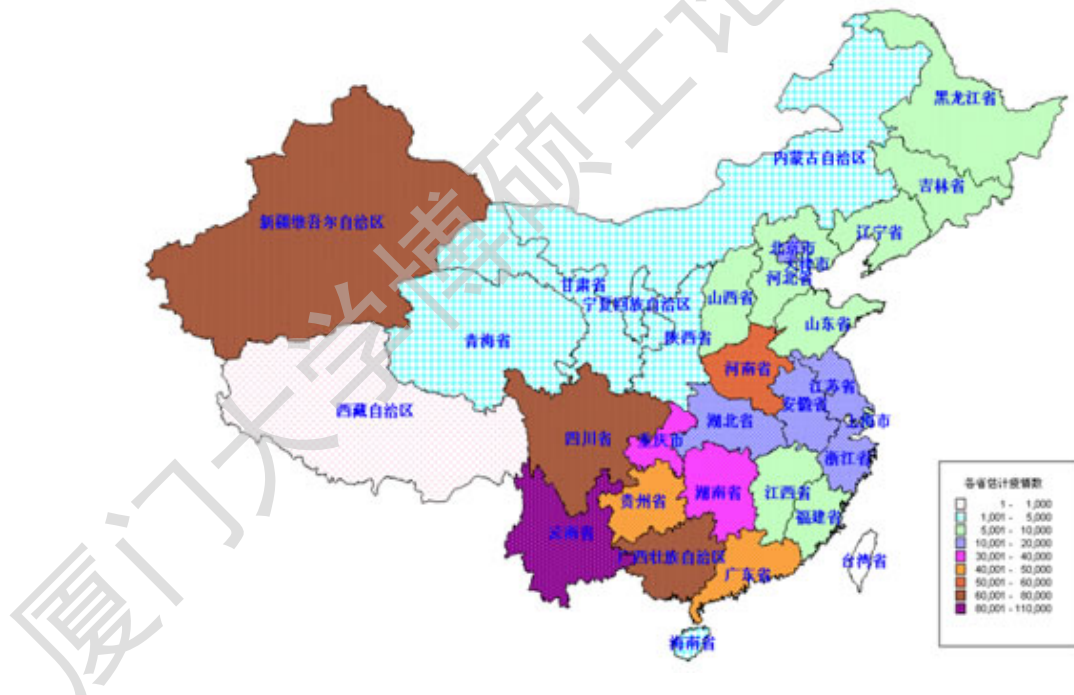


图 2. 2007 年全国艾滋病疫情估计结果地理分布图

Fig.2. Chinese people estimated to be living with HIV, 2007

图片来源: UNAIDS report 2008

2 HIV 的结构

2.1 HIV 的形态结构

HIV是一种单链RNA包膜病毒，电镜下呈球形（图3 A），直径在90-130nm之间，具有慢病毒特征性的锥形核心，该核心由衣壳蛋白组成(图3 B)。在衣壳内部有两条相同的RNA链，其上紧密结合着病毒的逆转录酶RT(p66和p51)、整合酶和核衣壳蛋白(p9和p6)。Vif和Nef蛋白与病毒核心紧密连接，估计每个病毒粒子中含有7~20个Vif蛋白^[4]。

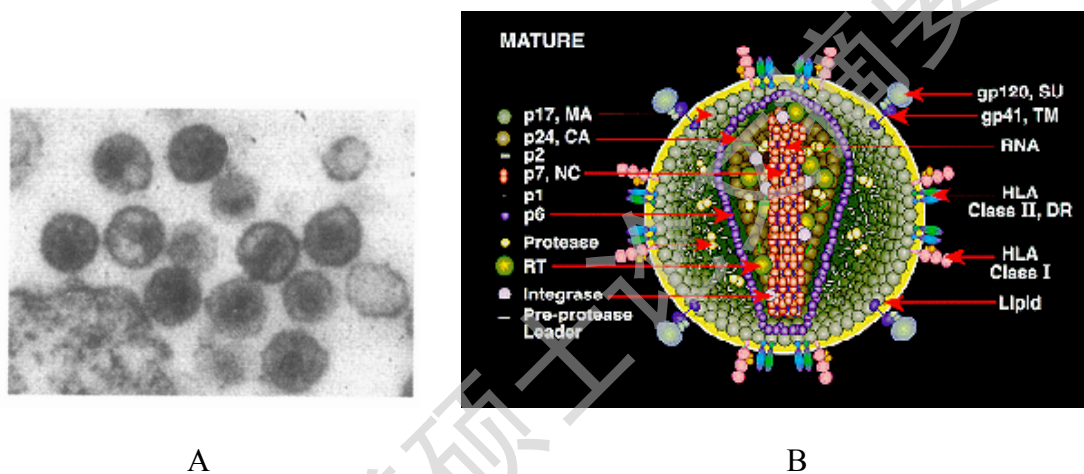


图 3. HIV-1 的结构

Fig.3. Schematic representation of the HIV-1 virion

A: The Electron micrograph of HIV-1;

B: Schematic representation of the HIV-1 virion organization

A 图片来源：国际病毒分类委员会官方网站

B 图片来源 <http://www.niaid.nih.gov/daids/dtpdb/VIRTARG.asp>

病毒衣壳外侧有两层膜结构，内层是十四酰化的内膜蛋白p17(MA)^[5]，对病毒颗粒的完整性至关重要。最外层主体为磷脂双分子层，厚度约7.5nm，同宿主细胞膜在组成及功能上都存在着明显差异。包膜中所含的大量胆固醇，可以消除磷脂的相变，降低膜的通透性，有利于保持病毒颗粒的稳定^[6]。在包膜的表面含有三聚体或四聚体gp120包膜蛋白和gp41穿膜蛋白组成的72个刺突状结构。

2.2 HIV基因组

HIV的基因组全长约9800nt，3个为所有逆转录病毒所共有的结构基因，分别

是gag (group specific antigen)、pol (polymerase) 和env (envelope) 基因, 其中gag基因与pol基因使用不同的阅读框架, 并有部分重叠。HIV所特有的基因是tat (transactivator) 和rev (regulator of expression of virion) 两个调节基因, 以及编码辅助蛋白的vpr (viral protein R)、vpu (viral protein U)、vpx (viral protein X)、vif (viral infectivity factor) 和nef (negative factor) 基因。其中vpu为HIV-1所特有, vpx为HIV-2所特有 (图4)。

长末端重复序列 (LTR) 位于HIV基因组RNA的两端, 可按核苷酸序列分为两端的R区及与之相邻的U3区和U5区。反转录完成后, HIV cDNA的两端各自形成完整的LTR, 其中三个亚区的序列均为 (5') U3-R-U5 (3')。

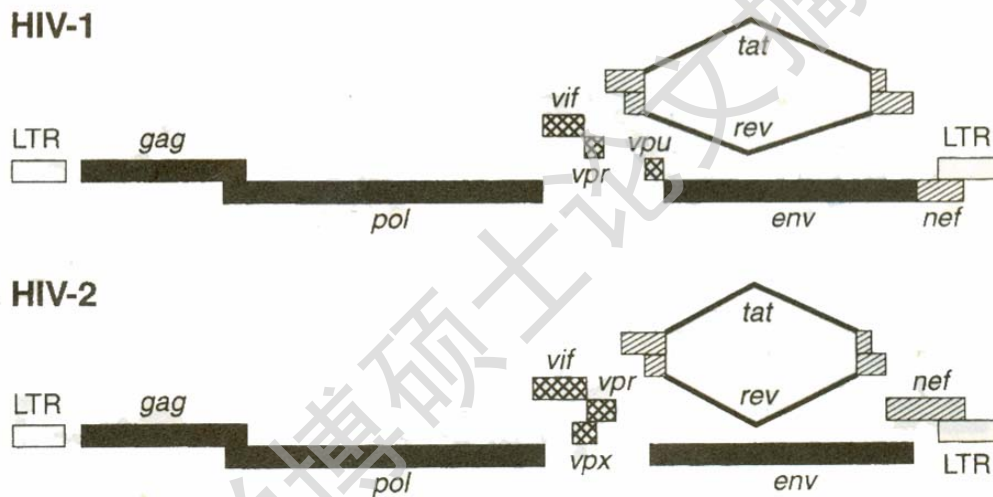


图4. HIV-1和HIV-2基因组^[7]

Fig.4. Schematic of the HIV-1 and HIV-2 genome

2.3 HIV所编码的蛋白质

2.3.1 HIV编码的各类蛋白质及其基本功能

HIV带有编码多种病毒蛋白的开放阅读框架, 主要转录物为一条全长的病毒mRNA, 以此为模板, 编码主要结构蛋白如gag和gag-pol融合蛋白。gag的前体p55蛋白被蛋白酶水解成p24、p17、p7和p6以及p1、p2等较小的蛋白。pol前体蛋白被裂解成病毒的逆转录酶 (RT)、整合酶和蛋白酶, 这3种酶在复制周期的不同时期起作用。RT作用于病毒复制早期; 整合酶则将病毒基因整合到宿主染色体上; 蛋白酶在病毒颗粒成熟的过程中起作用。gp160进一步剪切后得到包膜蛋白

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库